



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 100 33 219 A 1**

⑤ Int. Cl.⁷:
A 61 K 38/19

⑲ Aktenzeichen: 100 33 219.6
⑳ Anmeldetag: 7. 7. 2000
㉑ Offenlegungstag: 24. 1. 2002

DE 100 33 219 A 1

㉒ Anmelder:
Universität Heidelberg, 69117 Heidelberg, DE

㉓ Erfinder:
Erfinder wird später genannt werden

㉔ Entgegenhaltungen:
WO 99 17 798 A1
WO 00 04 926 A2
JP 05-2 46 885 A

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉕ Neuroprotektive Wirkung von Granulocyten-Colony Stimulierendem Faktor (G-CSF)

㉖ Verwendung von G-CSF (Granulozyten Colony Stimulating Factor) zur Herstellung pharmazeutischer Präparate mit neuroprotektiver Wirkung zur Behandlung akuter Ischämien wie z. B. Apoplexie und neurodegenerativer Erkrankungen wie z. B. bei der Parkinson- oder Alzheimer-Krankheit.

DE 100 33 219 A 1

Beschreibung

[0001] Verwendung von G-CSF (Granulozyten Colony Stimulating Factor) zur Herstellung pharmazeutischer Präparate mit neuroprotektiver Wirkung zur Behandlung akuter Ischämien.

[0002] Der Schlaganfall (Apoplexia cerebri) ist die dritthäufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern, zählt zu den führenden Ursachen dauernder Invalidität und Pflegebedürftigkeit und damit – ökonomisch betrachtet – zu der teuersten Krankheitsgruppe überhaupt. Zur Zeit erleiden in Deutschland etwa 150.000 Einwohner pro Jahr einen Schlaganfall, davon sterben 15–20 Prozent der Patienten innerhalb der ersten vier Wochen. Nur etwa ein Drittel der überlebenden Patienten erholt sich ohne größere bleibende Behinderung, während ebenfalls ein Drittel durch Lähmungen oder andere neurologische Ausfälle dauerhaft schwer behindert bleibt. Bei 80 Prozent der Patienten liegt dem Schlaganfall eine Durchblutungsstörung mit nachfolgender Ischämie in einem umschriebenen Gefäßterritorium zugrunde. Zu Durchblutungsstörungen im Gehirn kommt es meist entweder makroangiopathisch durch Thrombembolien bzw. hämodynamische Strömungsverlangsamungen oder mikroangiopathisch durch eine blutdruckbedingte Arteriosklerose der kleinen, intrazerebralen Endarterien. Dabei begünstigen eine Reihe von Risikofaktoren das Auftreten eines Schlaganfalles. Dies sind insbesondere die arterielle Hypertonie, zahlreiche Herzerkrankungen, die mit einem erhöhten Embolierisiko verbunden sind – vor allem das Vorhofflimmern –, der Diabetes mellitus, Zigarettenrauchen, Blutgerinnungsstörungen und zu einem geringeren Anteil die Hypercholesterinämie. Durch embolischen oder lokal thrombotischen Verschluss einer der großen hirnversorgenden Arterien entstehen die Territorialinfarkte, d. h. Infarkte, die ein umschriebenes Gebiet innerhalb des Versorgungsgebietes einer bestimmten Hirnarterie betrifft. Am häufigsten ist dabei das Versorgungsgebiet der Arteria cerebri media betroffen, ein Mediaterritorialinfarkt mit einem entsprechenden "Mediasyndrom" entsteht. Dies ist auch die häufigste Manifestation eines Schlaganfalles überhaupt. Bisher ist nur bei ausgewählten Patienten eine thrombolytische Therapie erfolgversprechend. In der letzten Jahren hat sich durch neue pathophysiologische Erkenntnisse und Methoden die Diagnostik und Therapie akuter zerebraler Ischämien erheblich gewandelt. Die Thrombolyse bietet die Möglichkeit zur therapeutischen Intervention innerhalb eines "therapeutischen Fensters" von 3 bis 6 Stunden nach Infarktereignis. Ziel ist die rasche Auflösung des Gefäßverschlusses und damit die Wiederherstellung der zerebralen Durchblutung und Verbesserung der neurologischen Symptomatik. Dies basiert auf der pathophysiologischen Vorstellung, dass die Wiedereröffnung eines verschlossenen zerebralen Gefäßes den Erhalt hypoperfundierten, reversibel geschädigten Hirngewebes (der sogenannten ischämischen Penumbra), und damit die Wiederherstellung neuronaler Funktionen unterstützt. Bisher kann diese Behandlung allerdings nur in ausgewiesenen neurologischen Zentren durchgeführt werden. Auch die Zulassung von rt-PA beim Schlaganfall in Deutschland steht noch aus. Die Lysetherapie nach 6 Stunden gilt als besonders nebenwirkungsreich (erhöhte Zahl intrakranieller Blutungen) und sollte daher unterbleiben. Andere Therapieverfahren sind zur Zeit nicht evaluiert. Momentan werden verschiedene andere Substanzen untersucht. Hier sind vor allem sog. Wachstumsfaktoren (bFGF) und Pharmaka, die die Thrombozytenadhäsion blockieren (anti-GP IIb/IIIa, Abcizimab), zu nennen. In den letzten Jahren wurden zahlreiche neuroprotektive Substanzen in klinischen Studien untersucht. Leider konnte keine dieser bisher getesteten Substan-

zen, die sämtlich im Tiermodell neuroprotektiv wirkten, in der klinischen Praxis ihren Nutzen beweisen. Vor allem die Glutamat-Antagonisten, freie Radikalfänger und NMDA Antagonisten blieben ohne klinischen Nutzen, oder zeigten im Gegenteil sogar erhebliche Nebenwirkungen, die den klinischen Einsatz unmöglich machen (Psychosen etc.). Andere Substanzen, die die leukozytäre Wandadhäsion hemmen (anti-ICAM-1) oder der Inhibitor der Glutamat-vermittelten NO Synthetase (Lubeluzol) blieben ohne positiven Effekt.

[0003] Aufgabe der Erfindung ist die Folgen einer akuten Ischämie zu lindern oder zu beseitigen durch Verabreichung von Substanzen mit neuroprotektiver Wirkung. Diese Aufgabe wird durch das Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst.

[0004] Die Verwendung von G-CSF (Granulozyten Colony Stimulating Factor) zur Herstellung pharmazeutischer Präparate mit neuroprotektiver Wirkung zur Behandlung akuter Ischämien stellt einen erfolgreichen Therapieansatz mittels neuroprotektiver Wachstumsfaktoren dar.

[0005] G-CSF, englische Abkürzung für "Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF)", reguliert als endogener, hämatopoetischer Wachstumsfaktor die Reifung, Proliferation und Differenzierung von neutrophilen Granulozyten. G-CSF wird natürlicherweise von verschiedenen Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten als Glykoprotein gebildet und zu den Cytokinen gezählt. G-CSF wird als rekombinanter humaner Faktor Filgrastim (Neupogen®/Firma Amgen GmbH, CAS-Nr. 121181-53-1) bereits zur Behandlung von Neutropenien und neutropenischem Fieber eingesetzt. Weitere rekombinante humane G-CSF sind Lenograstim und Molgramostim. Eine neuroprotektive Wirkung von G-CSF wurde bisher noch nicht beschrieben.

[0006] An 24 Wistar-Ratten wurde durch das international anerkannte Fadenmodell nach Longa et al eine 90 minütige Ischämie induziert. 30 Minuten nach Ischämieinduktion wurden 12 Ratten (n = 12) 2 ml NaCl intravenös über insgesamt 90 min infundiert; diese dienten als Kontrollgruppe (K). Die Therapiegruppe (T; n = 12) erhielt über denselben Zeitraum 20 Mikrogramm G-CSF in 2 ml NaCl gelöst. Vor Ischämieinduktion und 1, 2, 3, 4 und 24 Stunden danach wurde mittels ELISA (Biosource Europe, Fleurus, Belgien) die Konzentration von Interleukin 1-beta, IL-2, IL-6 und IL-10 bestimmt. Nach 24 Stunden wurden die Gehirne entnommen und von frontal 5 Hirnschnitte mit 2 mm Dicke angefertigt. Mittels TTC-Färbung wurde anhand von Schnitt 1, 2, 4 und 5 die Infarkt- und Hirnödemsgröße bestimmt. Schnitt 3 wurde weiter histologisch aufgearbeitet. Um die zerebrale Invasion mit neutrophilen Granulozyten nachzuweisen, wurde eine Myeloperoxidasefärbung MPO (DAKO, Carpinteria, CA, USA) durchgeführt. Durch Zugabe eines Anti-G-CSF-Antikörpers sollten Hinweise auf eine bisher noch nicht beschriebene Existenz des G-CSF-Rezeptors gefunden werden.

[0007] Zerebelläre Granulazellen wurden von P7-Mäusen gewonnen und nach einem etablierten Zellkulturmodell aufgearbeitet und gezüchtet. Nach 7 Tagen wurden die Granulazellen mit G-CSF behandelt und nach 30 min Glutamat zugegeben. Um die Überlebensrate der Zellen zu testen, wurde 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT, Sigma, München) 2 Stunden nach Glutamatstimulation appliziert. Nach weiteren 4 Stunden wurden die Zellen mit 1% SDS lysiert. Die Proben wurden bei 590 nm optischer Dichte gemessen. Des Weiteren wurde mittels einer PCR der G-CSF-Rezeptor nachgewiesen werden. Dazu wurde aus Mäusegehirnen RNA extrahiert (RNA-kit, AGS, Heidelberg). 10 Mikrogramm RNA wurden mit MMLV reverser Transkriptase transkribiert. Für die PCR

wurden Primer von Exon 5 und 7 des G-CSF-Rezeptors benutzt (Ashihara, 1997). Die statistische Analyse erfolgte für das Tierexperiment nach Anova mit Bonferroni-Korrektur für multiple Gruppen.

[0008] Kontroll- und Therapiegruppe unterschieden sich nicht in den gemessenen physiologischen Parametern (BGA, HKT, Blutdruck und Körpergewicht). Nach 24 Stunden wurde eine leichte Erhöhung der im Blut vorhandenen neutrophilen Granulozyten festgestellt, die nicht signifikant war. Die Infarktgröße in den TTC-Schnitten betrug für die G-CSF-behandelte Gruppe (T) 6,7% \pm 6,7% (n = 12) des Gesamthirnvolumens und war damit signifikant (p < 0,05) geringer als die der Kontrollgruppe mit 22,7% \pm 6,3% (n = 12). Das errechnete Hirnödeme war mit 4,7% \pm 6,6% in der G-CSF-Gruppe ebenfalls signifikant (p < 0,05) geringer als in der nicht-behandelten Gruppe mit 12,0% \pm 6,1%. Für alle gemessenen Interleukine bis auf IL-2 konnten signifikant geringere Scrumwerte in der G-CSF-Gruppe nachgewiesen werden (p < 0,05). In der histologischen Auswertung des Hirnschnittes 3 konnte bei der MPO-Färbung für beide Tiergruppen lediglich eine Zunahme der Invasion von neutrophilen Granulozyten festgestellt werden, die mit der Größe des Infarktes zunahm. Signifikante Unterschiede wurden nicht beobachtet. An den Hirnschnitten konnte die Bindung von anti-Rezeptor-G-CSF sowohl an Neuronen als auch an Axonen und Dendriten nachgewiesen werden. In der Zellkultur konnte eine signifikante Abnahme des Zelluntergangs beobachtet werden. Dieser Effekt nahm mit steigender G-CSF-Dosis zu. Die PCR wies durch PT-PCR den Mausezeptor im Hirngewebe nach. Das PCR-Produkt hatte die erwartete Größe von 567 bp und wurde durch PCR-Sequenzierung verifiziert.

[0009] Die Ergebnisse zeigen, dass G-CSF neuroprotektive Eigenschaften besitzt. Diese konnten sowohl im Tierexperiment über eine Verminderung des Infarktareals und Hirnödems in der G-CSF-behandelten Gruppe als auch an der Zellkultur durch einen mittels G-CSF vermindertem Glutamatschaden bewiesen werden. Wirkmechanismen bestehen in einer Aktivierung des intrazerebralen G-CSF-Rezeptors, und eine Verminderung bestimmter Interleukine, die in die Entzündungsvorgänge bei zerebraler Ischämie eingreifen. Da G-CSF endogen produziert wird, einen zerebralen Rezeptor besitzt und neuroprotektive Eigenschaften aufweist, reiht es sich in die Reihe der Neurotrophine wie BDNF, IGF und NGF ein. Nebenwirkungen konnte in unserem Experiment nicht festgestellt werden.

[0010] Da G-CSF ein seit mehreren Jahren etabliertes Medikament mit geringer Nebenwirkungsrate ist, enthält unsere Anwendungsmöglichkeit bei zerebraler Ischämie eine große praktische Relevanz. G-CSF stellt einen wirkungsvollen pharmazeutischen Wirkstoff für die bisher unbefriedigende Schlaganfalltherapie dar.

Patentansprüche

1. Verwendung von G-CSF (Granulozyten Colony Stimulating Factor) zur Herstellung pharmazeutischer Präparate mit neuroprotektiver Wirkung zur Behandlung akuter Ischämien und neurodegenerativer Erkrankungen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass G-CSF ein Polypeptid und/oder ein Glycoprotein ist, und/oder ein Derivat und/oder ein Analogon von G-CSF ist, welches Granulocyten Zellkolonie stimulierende Aktivität hat.
3. Verwendung nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass G-CSF entweder chemisch-synthetisch (z. B. Derivate, Analoga, Isomere) und/oder re-

kombinant hergestellt und/oder aus G-CSF bildenden Zellen isoliert wird.

4. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass akute Ischämien wie z. B. bei Apoplexie, Schädel-Hirn-Trauma oder Tumoren behandelt werden.

5. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass neurodegenerative Erkrankungen wie z. B. Parkinson, Alzheimer behandelt werden.

6. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das pharmazeutische Präparat fest, flüssig oder aerosolartig (z. B. Spray) ist.

7. Handelspackung enthaltend ein G-CSF haltiges pharmazeutisches Präparat zusammen mit Instruktionen für die Verwendung von G-CSF bei der neuroprotektiven Behandlung von akuter Ischämie oder neurodegenerativen Erkrankungen.

- Leerseite -